DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.054
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
352 2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)03-0352-02

三种生化法和基因检测诊断G6PD缺陷症

张渝美,邓 兵,王世一,朱 静,陈华琼,徐酉华,徐天鹤 (重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所,重庆 400014)

提 要:目的 联合三种生化法和基因检测对G6PD缺陷症进行诊断,以提高这种儿科临床常见溶血性疾病的确诊率。方法 采用高铁血红蛋白还原试验、G6PD活性试验、G6PD定量比值法三种生化实验并联合应用南方地区常见的三种G6PD基因突变检测对急性溶血患儿57例进行诊断。结果 57例患儿中,高铁血红蛋白还原率降低52例,正常5例;G6PD活性低下51例,正常6例;G6PD/6PGD降低48例,正常9例。三种生化检测阳性率分别为91.2%、89.5%和84.2%;52例被检出存在基因突变,其中位点G1388A 32例(61.5%)、G1376T 16例(30.8%)、A95G 4例(7.7%)。另有5例未能检测到有突变,估计属其它少见突变类型。结论 联合应用三种生化法和基因检测可以提高G6PD缺陷的确诊率。

关键词:急性溶血;G6PD;生化检测;基因检测
中图法分类号:R446.112;R446.9;R722.11 文献标识码:A

Diagnosis of G6PD with biochemical methods and gene detection

ZHANG Yu-mei, DENG Bing, WANG Shi-yi, ZHU Jin, CHEN Hua-qiong, Xu You-hua, XU Tian-he (Children's Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To establish a more effective method for diagnosis of G6PD with three biochemical methods combined with gene detection. Methods With methemoglobin reduction test (MRT), G6PD activity analysis (GAA) and G6PD/6GPD specific value detection (G6SVD) combined with PCR were used for diagnosis of 57 cases with acute hemoglytic anemia patients. Results Fifty-two cases in 57 cases of MRT were decreased, 5 cases were nomal. 51 cases the G6PD activities were lower than those of nomal controls. The G6PD/6GPD specicific values were reduced in 48 cases, 9 cases were nomal. The positive rates of MRT, GAA, G6SVD were 91.2%, 89.5% and 84.2% respectively. Fifty cases had been found the gene mutations: 32 cases (61.5%) were G1388A mutations, 16 cases (30.8%) were G1376T, and 4 cases (7.7%) were A95G mutations. Conclusion The study suggests that application of both biothchmial methods and gene detection would improve the accurate and effective diagnosis for G6PD.

Key words: acute hemoglytic anemia; G6PD; biochemical method; gene detection

红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)是磷酸戊糖旁路中产生还原型辅酶Ⅱ(NADPH)的关键酶。以G6PD基因突变为分子基础的G6PD缺陷症是最常见的X连锁遗传病,临床上表现为新生儿黄疸、蚕豆病、药物性溶血、感染性溶血和非球形细胞溶血性贫血等疾病。我国南方为高发区,在儿童及婴幼儿期集中表现为蚕豆病和新生儿黄疸,往往病情较重,如不及时救治将危及患儿生命。为了提高G6PD缺陷症的确诊率,我院开展了高铁血红蛋白还原试验、G6PD活性测定、G6PD定量比值法和G6PD基因检测。现将三种生化学试验和基因检测结果及其在临床上的意义作一探讨和分析。

1 对象和方法

1.1 对象

2001年3月至5月我院收治的急性溶血患儿57例。其中疑诊为蚕豆病44例,新生儿黄疸13例。男性46例,女性11例。年龄1 d至7岁。

1.2 方法

采集患儿静脉血。高铁血红蛋白还原实验参照《全国临床检验操作规程》;G6PD活性试验(NBT法)及杜传书教授[3]介绍的G6PD比值法测定患儿的高铁血红蛋白还原率,G6PD活性和G6PD比值。采用本室改进化学裂解及高盐法提取基因组DNA,适量TE缓冲液溶解后,4 ℃保存备用。

1.3 特异等位基因的聚合酶链反应

针对3种不同点突变的3对特异引物G1388A、G1376T、A95G(具体序列参照文献[1]),内对照采用人β珠蛋白基因扩增片段(601 bp)。扩增反应总体积25 μl:10× 反应缓冲液2.5 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 2.0 μl,10 mmol/L 4× dNPTS 0.25 μl,20 μmol/L引物L及G1376T(或G1388A)各0.5 μl,内对照引物1和内对照引物2各0.25 μl,TaqDNA聚合酶1.5 U,基因组DNA 2 μl,反应在PE公司热循环仪上进行,反应条件为95 ℃变性4 min CR产物与2 μl上样缓冲液混合,于1.5%琼脂糖凝胶中电泳,EB染色,紫外透射仪上观察结果并照相记录,见图1。其中1为阴性对照,只有601 bp内对照;2、3为G1376T突变,含有601 bp内对照和345 bp特异扩增带;4、为G1388A突变,含有601 bp内对照和361 bp特异扩增带;5为A95G突变,含有601 bp内对照和227 bp特异扩增带;6为分子量标准。

作者简介:张渝美(1958—),女,重庆市人,主管检验师,主要从事生化检验方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)63632756—3410

收稿日期:2001-12-05;修回日期:2002-02-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

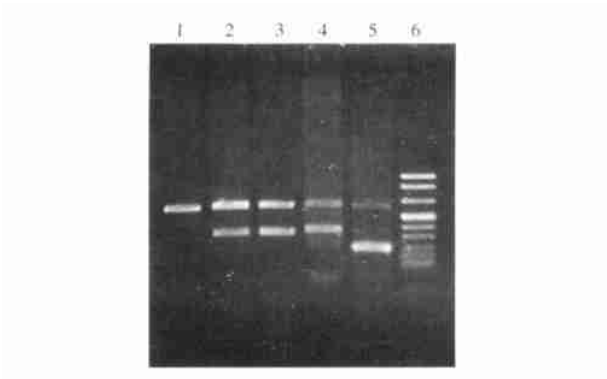


图 1　1.5% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1　Electrophoresis in 1.5% agrose gel

2　结果

57 例患儿中, 高铁血红蛋白还原率降低 52 例, 正常 5 例。G6PD 活性低下 51 例、正常 6 例, G6PD/6PGD 降低 48 例, 正常 9 例。阳性率分别为 91.2%、89.5% 和 84.2%。

57 例患儿中, 有 52 例检测到基因突变, 其中 G1388A 32 例, G1376T 16 例, A95G 4 例。其发生频率分别为 61.5%、30.8% 和 7.7%。阳性检出率为 91.2%, 另有 5 例未检出突变, 估计属其它少见突变类型。

3　讨论

本组 57 例样本中, 被检出有基因突变的 52 例, 其中 1 例高铁血红蛋白还原率和 G6PD 活性正常为 A95G 突变, 1 例高铁血红蛋白还原率和 G6PD 比值正常为 G1388A 突变, 2 例 G6PD 活性和 G6PD 比值正常分别为 G1388A、A95G 突变。其余样本化学法检测均有两项以上显示异常结果, 无 1 例三项化学法检测正常而检出有基因突变的样本。所以, 用三种方法联合检测加基因分析, 可以提高 G6PD 缺陷症的检出率。本组基因分析检出的 52 例突变类型中, G1388A 突变频率最高, 为 61.5%, 其次为 G1376T, 为 30.8%, 二者合计为 92.3%。这与文献[1~3] 报道的结果相似。不同的是广东、广西两地以 G1376T 最多见。表明 G6PD 突变具有地区性分布特点且有较高的遗传多态性。

高铁血红蛋白还原试验, G6PD 活性检测及 G6PD 定量比值法三种化学试验方法简单, 价格低廉, 适宜在基层医院开展, 但准确性较差, 存在着假阳性或假阴性。而基因检测准确性较高, 是一种灵敏、特异而快速的诊断技术, 但需要一定的技术和设备。因此, 我们认为联合应用生化法和基因分析检测, 可提高临床诊断的准确性。然后对 G6PD 缺陷的患者建立遗传病档案, 及时向患者或其监护人说明该病潜在的危险性, 避免服用氧化药物和食用蚕豆等以防患于未然, 这对儿童健康成长有益处。

参考文献:

[1] 何永蜀, 杜传书, 任晓琴, 等. 云南省几个民族葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变型分析[J]. 中华血液学杂志, 1997, 18(3): 193－196.

[2] 谢建生、龙桂芳、唐霞等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变与 N Ia III多态性位点连锁关系研究[J]. 中华血液学杂志, 2000, 21(4): 187－189.

[3] 杜传书. 红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症检测的 G6PD/6PGD 比值法[J]. 优生与遗传, 1991, 4(1): 1－3.

[4] Ainoon O, Joyce J, Boo N Y, *et al*. Glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Malaysian Chinese[J]. Hum Muimi, 1999, 14(4): 352.

[5] Samilchuk E, Dsouza B, Ai-Awadi S, *et al*. Population study of common glucose-6-phosphate dehydeogenase mutation in Kuwait[J]. Hum Hered, 1999, 49(1): 41－44.

（编辑　王　红）

（上接 351 页）

2.1.3　结果　　通过计算, 可得:

$X=-0.04039$, $Y=-0.05217$, $r=0.06598$, $\bar{\alpha}=232.25^{\circ}$, $s=55.40^{\circ}$

故高峰时期间为 8 月 25 日($P<0.05$), 高峰时期: 7 月 1 日～10 月 20 日($\bar{\alpha}\pm s$)。

2.2　门诊资料(按周)统计方法

对表 2 数据进行列联表分析[2], 所得结果见表 2 中括号数据(校正残差)。当其绝对值超过 1.96 时, 说明该项的分布与总体的分布有显著差异。

3　讨论

通过圆形分布法得知 1 年 12 个月的门诊人数中较明显存在着高峰时间, 且季度、月门诊人数的构成比均有显著性差异($P<0.05$)。从表 2 可见, 一周中周 1 为高峰日, 无论是门诊人数最少还是最多的月份, 周一的门诊量在整周中所占比例较其余几天所占比例偏高, 且其偏高性与月份没有关系。

以上这些结果为我们在高峰时期合理安排人力、物力和财力提供了科学的依据。因此为更好解决病人看病难的问题, 医院必须加强这一时间的门诊力量: 一方面, 医院首先应建立良好的门诊秩序, 加强门诊咨询服务及诊疗科室护士工作, 在门诊挂号高峰增设挂号人员, 并且建立健全门诊管理制度, 加强计算机管理培训, 进一步提高工作效率; 另一方面, 医院应加强门诊医生的技术力量, 以副教授以上职称的医生坐诊为主力, 包括反聘退休教授, 搞好传、帮、带, 提高医院的技术服务水平; 再者, 为解决周一门诊量高的问题, 应在周六、周日均开展门诊减免挂号费、优惠检查费等活动, 使得在一定程度上分流周一的门诊病人, 同时也使医院取信于民。

关键词: 圆形分布; 高峰时期; 就诊时间
中图法分类号: R197.3　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 郭祖超, 尹全焕, 史秉璋等. 医用数理统计方法[M]. 第 3 版, 北京: 人民卫生出版社, 1988. 135－139, 907.

[2] 洪　楠, 林爱华, 李志辉等. Spss for windows 统计分析教程[M]. 北京: 电子工业出版社, 1999. 107－117.

（编辑　潘式文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net